

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



5)

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 1/04, A23K 3/03, A23L 1/03, A23K 1/00 // (C12N 1/04, C12R 1:25)</p>		<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/57242</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. November 1999 (11.11.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/02925</p>		<p>(74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Ludwigsplatz 4, D-67059 Ludwigshafen (DE).</p>	
<p>(22) Internationales Anmeldedatum: 29. April 1999 (29.04.99)</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HU, ID, IL, IN, JP, KR, KZ, LT, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, ZA, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p>	
<p>(30) Prioritätsdaten: 198 19 475.7 30. April 1998 (30.04.98) DE</p>		<p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): BASF AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DE); D-67056 Ludwigshafen (DE).</p>	
<p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): RUNGE, Frank [DE/DE]; Burgunderstrasse 1a, D-67133 Maxdorf (DE). COOPER, Bryan [US/DE]; Robert-Blum-Strasse 5, D-68199 Mannheim (DE). BRÖCKEL, Ulrich [DE/DE]; Marcigny- strasse 11, D-67251 Freinsheim (DE). HEINZ, Robert [DE/DE]; Ungsteiner Strasse 11, D-67067 Ludwigshafen (DE). HARZ, Hans-Peter [DE/DE]; Am Mönchsbusch 22, D-67373 Dudenhofen (DE). EIDELSBURGER, Ulrich [DE/DE]; Lindenweg 4, D-67258 Hessheim (DE). KÄSLER, Bruno [DE/DE]; Magdeburger Strasse 72, D-67071 Ludwigshafen (DE). KELLER, Thomas [DE/DE]; In der Halt 5, D-67308 Lautersheim (DE).</p>		<p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	

(54) Title: **DRIED MICROORGANISM CULTURES AND METHOD FOR PRODUCING SAME**

(54) Bezeichnung: **TROCKENE MIKROORGANISMENKULTUREN UND VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG**

(57) Abstract

The invention relates to dried microorganism cultures containing at least one microorganism species on a support, characterized in that they are present in the form of particles which a) have a particle size of at least approximately 0.1 mm and b) are compacted. The invention also relates to a method for producing dried microorganism cultures and to their use in the production of food and animal feed.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft trockene Mikroorganismenkulturen, enthaltend wenigstens eine Mikroorganismen-Spezies in geträgerter Form, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie in Form von Partikeln vorliegen, welche a) eine Partikelgröße von wenigstens etwa 0,1 mm aufweisen und b) verdichtet sind; Verfahren zur Herstellung trockener Mikroorganismenkulturen sowie deren Verwendung zur Herstellung von Nahrungs- und Futtermitteln.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Trockene Mikroorganismenkulturen und Verfahren zu deren Herstellung

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige trockene Mikroorganismenkulturen, welche insbesondere zur Herstellung von Nahrungsmitteln brauchbar sind, sowie Verfahren zur Herstellung
10 trockener Mikroorganismenkulturen.

Ein Hauptanwendungsgebiet von Mikroorganismen, wie Bakterien und Hefen, ist die Herstellung von Nahrungsmitteln und Futtermitteln. So werden beispielsweise Milchsäurebakterien, wie zum Beispiel
15 solche der Gattung *Streptococcus* sp. oder *Lactobacillus* sp., bei der Herstellung von Milchprodukten, wie Sauerrahm, Buttermilch, Joghurt, Kefir, Kumis, Quark sowie bei der Herstellung von Sauer- teig und zur Konservierung von Rohwurst, wie z. B. Salami, ver- wendet. Bei der Herstellung von Futtermitteln, wie z. B. Silage,
20 kommen ebenfalls Milchsäurebakterien, wie z. B. solche der Gat- tung *Lactobacillus* sp., zum Einsatz.

Die zur Herstellung von Nahrungsmitteln erforderlichen Mikroorganismenpräparate kommen gewöhnlich in Form sogenannter Starterkulturen zum Einsatz. Hierbei handelt es sich zumeist nicht um frisch hergestellte Flüssigkulturen, sondern entweder um gewöhnlich in flüssigem Stickstoff tiefgefrorene Kulturen oder Trockenpräparate. Trockenpräparate sind üblicherweise bevorzugt, da deren Transport und Lagerung im Vergleich zu tiefgefrorenen
30 Präparaten technisch weniger aufwendig ist.

Aus dem Stand der Technik sind unterschiedlichste Formen trockener Zubereitungen von Mikroorganismenkulturen bekannt. So beschreibt beispielsweise die EP-A-0 131 114 ein *Lactobacillus*-Präparat, wobei eine Zellsuspension der Bakterien auf eine pulver-
35 oder granulatförmige Trägermasse aufgetragen und getrocknet wird. Zur Lagerung des Präparates ist es jedoch erforderlich, dieses in einer sauerstofffreien Schutzgasatmosphäre zu verpacken. In der DD 840493952 wird vorgeschlagen, kultivierte Mikroorganismen- stämme zur Herstellung von Starterkulturen gefrierzutrocknen, in
40 Folie zu verpacken und bei 279 bis 288 Kelvin zu lagern. Die JP- A-06/217713 beschreibt die Herstellung spezieller *Lactobacillus*-Starterkulturen durch Sprühtrocknung. In der EP-A-0 202 409 wird vorgeschlagen, Trockenkulturen einer Nassgranulierung zu unter- ziehen, das Granulat zu kugelförmigen Partikeln zu verarbeiten
45 und anschließend zu trocknen. Außerdem wird in einer Reihe von

Publikationen vorgeschlagen, beschichtete trockene Bakterienpräparate bereitzustellen (vgl. z. B. US-A-3,677,897).

Für die Herstellung trockener Mikroorganismenpräparate werden im 5 Stand der Technik eine Reihe unterschiedlicher Verfahren beschrieben. Neben den oben bereits erwähnten Gefriertrocknungs- und Wirbelschichttrocknungsverfahren stellt eine weitere Herstellungsalternative die Sprühtrocknung einer Mikroorganismensuspension dar. So beschreiben beispielsweise Stadhouders, J. et al., 10 in Neth. Milk Dairy J. (1969) 23, 182 die Sprühtrocknung von Milchsäurebakterien bei 70 °C, gekoppelt mit einem Nachtrocknungs- schritt bei 27 °C im Vakuum. Zur Trocknung wird offensichtlich keine vorkonditionierte, d. h. vorgetrocknete Luft verwendet. Dem Sprühgut wird vor der Trocknung eine Calciumhydroxidaufschämmung 15 zugesetzt. Das bei der Sprühtrocknung gebildete Calciumlactat ist insofern von Vorteil, als es eine geringere Hygroskopizität aufweisen soll. In anderen, aus dem Stand der Technik bekannten Sprühtrocknungsverfahren werden Bakteriensuspensionen versprüht, denen zuvor verschiedene Trägermaterialien zugesetzt wurden. So 20 wird beispielsweise gemäß SU 724113 eine mit Trockenmilchpulver, Melasse und Natriumglutamat versetzte Bakteriensuspension versprüht. Gemäß SU 1616990 wird eine mit dem Mineral Palygorskit versetzte Bakteriensuspension sprühgetrocknet. Die WO-A-88/06181 beschreibt die Sprühtrocknung einer mit Ton versetzten Bakterien- 25 suspension. Die JP-A-69/67989 beschreibt die Sprühtrocknung von Hefe- oder Bakterienzellen, welche in einer neutralen oder schwach sauren Lösung suspendiert sind, die Proteine, Carboxymethylcellulose, Alginat oder Alginatester, Di- oder höhere Saccharide oder mehrwertige Alkohole enthält.

30 Die bisher aus dem Stand der Technik bekannten trockenen Mikroorganismenpräparate, insbesondere solche, welche für die Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln Verwendung finden, weisen wenigstens einen der folgenden Nachteile auf:

35 1) Der Gehalt lebensfähiger Keime pro Gewichtseinheit des Trockenmaterials ist herstellungsbedingt sehr gering, so dass große Volumina des Trockenpräparates bei der Endanwendung einzusetzen sind;

40 2) die Lagerstabilität ist zu gering, so dass die Trockenpräparate innerhalb weniger Wochen verbraucht werden müssen, wenn keine Lagerung unter technisch aufwendigen Bedingungen möglich ist;

45

- 3) die Trockenpräparate weisen einen hohen Staubanteil auf, wodurch deren Verarbeitung erschwert wird;
- 4) die mechanische Stabilität ist sehr gering, so dass bei Abmischungen der Präparate mit mineralischen Zusätzen ein feinteiliger Abrieb gebildet wird und eine Entmischung des Feststoffpräparates zu beobachten ist;
- 5) die Lösungsgeschwindigkeit der Trockenpräparate ist nicht zufriedenstellend, so dass der gewünschte mikrobiologische Prozess für die Herstellung des Nahrungs- oder Futtermittels nur langsam anläuft und unerwünschten Mikroorganismen die Möglichkeit zur Vermehrung gegeben wird, was zu erheblichen Qualitätsverlusten führen kann.

15

Auch die aus dem Stand der Technik bisher bekannten Herstellungsverfahren, insbesondere die bisher beschriebenen Sprühtrocknungsverfahren, sind aus wenigstens einem der folgenden Gründe nicht zufriedenstellend:

20

- 1) die Verfahren sind technisch sehr aufwendig;
- 2) die Überlebensrate der Mikroorganismen bei der Trocknung ist zu gering;
- 3) der Feuchtegehalt des Trockenproduktes ist zu hoch.

Eine erste Aufgabe der vorliegenden Erfindung betrifft somit die Bereitstellung besserter trockener Mikroorganismenkulturen, welche die oben genannten, aus dem Stand der Technik bekannten Mängel weitgehend nicht mehr aufweisen. Insbesondere sollen gegenüber dem Stand der Technik verbesserte Starterkulturen bereitgestellt werden. Die erfindungsgemäßen Starterkulturen sollen vor allem eine verbesserte Herstellung von Silage ermöglichen.

35

Eine zweite Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung besserter Verfahren zur Herstellung trockener Mikroorganismenkulturen. Insbesondere sollte ein verbessertes Verfahren zur Sprühtrocknung von Mikroorganismenkulturen bereitgestellt werden, welches die Herstellung von Trockenpräparaten mit einem hohen Gehalt an lebensfähigen Keimen und hoher Lagerstabilität ermöglicht.

45

Gelöst wird obige erste Aufgabe durch Bereitstellung einer trockenen Mikroorganismenkultur, enthaltend wenigstens eine Mikroorganismen-Spezies in geträgerter Form, dadurch gekennzeichnet, dass die Kultur in Form von Partikeln vorliegt, welche

5

- a) eine Partikelgröße von wenigstens etwa 0,1 mm aufweisen und
- b) verdichtet sind.

10 Die erfindungsgemäßen partikelförmigen Kulturen sind aufgrund der gewählten Korngröße praktisch staubfrei. Der Staubanteil liegt vorzugsweise im Bereich von etwa 0,01 bis 0,05 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht der Trockenkultur. Dies entspricht einer mit einem Casella-Gerät gravimetrisch bestimmten Staubzahl im Bereich von etwa 1 bis 12 .

15 Die erfindungsgemäßen Partikel besitzen außerdem einen verdichten, d.h. kompakten Aufbau. Diesen erreicht man vorzugsweise durch einen später genauer erläuterten und bisher für trockene 20 Mikroorganismenpräparate bisher nicht beschriebenen Verdichtungsschritt bei deren Herstellung. Dabei wird ein, beispielsweise durch Sprüh-, Gefrier- oder Wirbelschichttrocknung erhaltenes pulverförmiges Vorprodukt (wie z.B. das später beschriebene, mit einer erfindungsgemäßen Sprühtrocknungsvariante erhältliche Pul- 25 verkonzentrat), das gewöhnlich einen signifikanten Staubanteil (z.B. eine Staubzahl von etwa 25 bis 100) aufweist, mechanisch verdichtet.

30 Die Verdichtung kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß man das pulverförmige Vorprodukt unter Einwirkung von Linienkräften, z.B. im Bereich von etwa 5 bis etwa 25 kN/cm, insbesondere etwa 10 bis etwa 15 kN/cm, z. B. in herkömmlichen Kompaktierzvorrichtungen kompaktiert. Das Vorprodukt kann aber auch unter Einwirkung von Drücken im Bereich von etwa 50 bis etwa 250 MPa, insbesondere im 35 Bereich von etwa 80 bis 200 MPa, wie z.B. etwa 90 bis etwa 160 MPa, z.B. in üblichen Tablettenpressen, tablettiert werden. Besonders bevorzugt ist die Verdichtung durch Kompaktieren. Weiterhin bevorzugt ist die Kompaktierung erfindungsgemäß durch Sprühtrocknen erhaltener Pulverkonzentrate.

40

Durch die Bereitstellung von Mikroorganismenkulturen des oben beschriebenen Typs wird überraschenderweise erreicht, dass die Verarbeitung, insbesondere als Starterkulturen, deutlich vereinfacht wird und außerdem die mechanische Stabilität der Partikel und so- 45 mit die Gefahr der Entmischung von Starterkulturpräparaten deutlich verringert wird. Überraschenderweise wurde auch festgestellt, daß die Verdichtung des pulverförmigen Vorprodukts die

Produktqualität bezüglich der Anzahl lebensfähiger Keime praktisch nicht beeinträchtigt. Vielmehr wird durch die erzielte hohe Dichte das Eindringen von Luft und Feuchtigkeit in die erfindungsgemäßen Trockenpräparate so signifikant verringert, daß eine 5 wesentliche Verbesserung der Lagerstabilität erreicht werden kann. So konnten beispielsweise Überlebensraten von 60% und mehr nach einjähriger Lagerung bei Raumtemperatur erzielt werden. Derart vorteilhafte Lagerstabilitätsdaten wurden bisher nicht beschrieben.

10

Insbesondere können die verdichteten Partikel kompaktiertes Brechgut (d.h. durch Zerkleinern und gegebenenfalls Klassieren von kompaktierten Produktsträngen erhaltenes Material) mit einem Durchmesser von etwa 0,1 mm bis etwa 2 mm, vorzugsweise 0,3 bis 15 1,25 mm, umfassen. Der Durchmesser stellt dabei einen rechnerisch aus der Massensummenverteilung der verdichteten Partikel ermittelten Wert dar und entspricht dem Durchmesser massengleicher Kugeln. Die Bruchkantenlänge der Partikel liegt etwa im Bereich von 0,1 bis 2 mm, insbesondere etwa 0,1 bis 1,4 mm.

20

Die verdichteten Partikel können außerdem als Tabletten beliebiger Form, wie z.B. rund, eckig oder oval, mit einem Durchmesser von etwa 2 bis 50 mm und einem Verhältnis von Durchmesser zu Dicke von etwa 1:0,1 bis etwa 10:1, insbesondere etwa 1:1 bis 25 etwa 5:1, vorliegen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthalten die trockenen Mikroorganismenkulturen als weitere Komponente einen Brausezusatz, umfassend eine Säurekomponente, wie 30 z. B. eine organische, nichtflüchtige Carbonsäure, und eine gasbildende Komponente, wie z. B. eine CO₂-bildende Komponente. Derartige Brauseformulierungen besitzen den besonderen Vorteil einer überraschend schnellen Auflösung nach Applikation der Starterkultur. Als Folge dieser schnellen Auflösung der Starterkultur in 35 dem sie umgebenden Milieu ist eine rasche Vermehrung der Starterkulturmikroorganismen gewährleistet, wodurch Qualitätsverluste des mit Hilfe der Starterkultur herzustellenden Produkts überraschend gut vermeidbar sind.

40 Vorzugsweise enthält eine erfindungsgemäße verdichtete Trockenkultur als Träger wenigstens ein Matrixmaterial zur Einbettung der Mikroorganismenzellen und gegebenenfalls wenigstens ein weiteres, die Zellen stabilisierendes Additiv.

45 Der in den erfindungsgemäßen Trockenkulturen verwendete Träger umfasst wenigstens eine, üblicherweise frisch gezüchteten Mikroorganismen vor der Trocknung als Coformulans zugesetzte Matrix-

komponente, ausgewählt unter Mono-, Oligo- und Polysacchariden, Polyolen, Polyethern, Polymeren, wie CMC oder PVP, Oligo- und Polypeptiden, aus natürlichen Quellen, wie z.B. Milch, Fleisch oder Getreide, abgeleitete Stoffe oder Stoffgemische, wie z.B. Süßmol-
5 kepulver, Weizengrießkleie, Pepton, Alginate, mineralischen Verbindungen, oder Gemischen solcher Matrixsubstanzen. Weiterhin können stabilisierend wirkende Additive zusammen mit der Matrix-
substanz oder später zugesetzt werden, beispielsweise Antioxidan-
zien, wie α -Tocopherol oder Ascorbinsäure, oder Gemische davon.
10 Darüber hinaus können weitere Substanzen stabilisierend wirken, die ausgewählt sind unter anorganischen Salzen, wie Alkali- oder Erdalkalichloride, anorganischen oder organischen Puffern, wie Alkaliphosphatpuffer, Aminosäuren, wie Asparagin- oder Glutaminsäure und den Salzen davon, organischen Carbonsäuren, wie Citro-
15 nensäure, organischen, nichtflüchtigen Lösungsmitteln, wie DMSO, und weiteren Verbindungen, wie β -Carotin und Gemischen solcher Additive.

Die erfindungsgemäßen Mikroorganismenkulturen umfassen vorzugs-
20 weise lebensfähige Mikroorganismen in einer Konzentration von 10^8 bis 10^{12} cfu (colony forming units)/g Trockenkultur. Die er-
findungsgemäß hergestellten Pulverkonzentrate enthalten etwa $5 \cdot 10^8$ bis $1 \cdot 10^{12}$, vorzugsweise etwa $4 \cdot 10^{11}$ bis $8 \cdot 10^{11}$ cfu/g. Die erfin-
dungsgemäßen verdichteten Kulturen enthalten etwa $1 \cdot 10^{11}$ bis
25 $4 \cdot 10^{11}$, insbesondere etwa $3 \cdot 10^{11}$ cfu/g. Starterkulturen zur Silageherstellung enthalten etwa 1 bis $7 \cdot 10^{10}$, insbesondere etwa $3 \cdot 10^{10}$ cfu/g.

Dabei können die Mikroorganismen von einer oder mehreren Mikroor-
30 ganismenspezies abgeleitet sein. Eine besonders bevorzugte Spe-
zies sind Milchsäure produzierende Bakterien, wie z.B. solche, die zur Silageherstellung geeignet sind, wie beispielsweise *Lac-
tobacillus plantarum*.

35 Silage im Sinne der vorliegenden Erfindung umfaßt durch Einwir-
kung von Mikroorganismen haltbar gemachten Futterpflanzenpro-
dukten, beispielsweise basierend auf Gras, Klee, Stroh, Maispflan-
zen, Futterrüben, Hülsenfrüchten, Getreide, wie z.B. Mais und
Weizen, und dergleichen.

40

Die oben beschriebene zweite Aufgabe der vorliegenden Erfindung wird überraschenderweise gelöst durch Bereitstellung eines Sprüh-
trocknungsverfahrens zur Herstellung einer trockenen Mikroorga-
nismenkultur, enthaltend wenigstens eine Mikroorganismen-Spezies
45 in geträgerter Form, dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) in einer wenigstens eine Mikroorganismen-Spezies enthaltende Flüssigkeit wenigstens eine zur Ausbildung eines Trägers geeignete Substanz löst oder suspendiert,
- 5 b) das so erhaltene Gemisch in einem Sprühtrockner trocknet, wobei man zur Sprühtrocknung ein konditioniertes, getrocknetes und auf eine Temperatur im Bereich von mehr als etwa 80 °C, insbesondere auf etwa 90 bis etwa 135 °C, vorzugsweise etwa 100 bis etwa 110 °C, wie z.B. etwa 105 °C erhitztes Gas verwendet, und
- 10 c) das Trockengut aus dem Sprühtrockner entfernt, wobei dieses eine Austrittstemperatur von etwa 40 bis 85 °C, insbesondere etwa 45 bis 75 °C, vorzugsweise etwa 50 bis 65 °C, wie z.B. etwa 55 °C, aufweist.
- 15

Dieses erfindungsgemäße Sprühtrocknungsverfahren wird im folgenden auch als trägergebundenes Sprühtrocknungsverfahren bezeichnet. Das zur Trocknung verwendete Gas ist vorzugsweise ein getrocknetes Gas mit einem Taupunkt von weniger als +5 °C, insbesondere mit einem Taupunkt von etwa -10 bis etwa -50 °C, wie z. B. konditionierte Pressluft oder konditionierter Stickstoff. Beispielsweise kann Pressluft mit einem Taupunkt von etwa -25 °C und Stickstoff mit einem Taupunkt von etwa -40 °C eingesetzt werden.

20 Ein Taupunkt von +5 °C entspricht in etwa 5 g Wasser pro m³ Luft.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Sprühtrocknungsverfahrens wird in einer nachgeschalteten, weiteren Stufe d) das Trockengut einer Nachtrocknung unterzogen. Die 30 Nachtrocknungstemperatur liegt im Bereich von etwa 15 bis 50 °C, wie z. B. bei etwa 25 bis 40 °C. Die Nachtrocknung erfolgt beispielsweise in einer Gasatmosphäre oder im Vakuum; alternativ dazu besteht außerdem die Möglichkeit, ein Trocknungsmittel mit dem gemäß Stufe c) erhaltenen trockenen Mikroorganismenpräparat 35 homogen zu vermischen.

Aufgrund seiner Auslegung gestattet das erfindungsgemäße Sprühtrocknungsverfahren überraschenderweise die Trocknung von Mikroorganismensuspensionen mit Überlebensraten bis zu 100 %. Aufgrund der Verwendung von konditioniertem Gas bei der Sprühtrocknung sowie dem optionalen Nachtrocknungsschritt werden überraschenderweise Trockenpräparate mit extrem niedrigem Feuchtegehalt (von etwa 2 bis 3 Gew.-% Wasser), entsprechend einer Wasseraktivität a_w von 0,03 bis 0,15, zur Verfügung gestellt. Dies hat unmittelbar zur Folge, dass die erfindungsgemäß sprühgetrockneten und gegebenenfalls nachgetrockneten Mikroorganismenkulturen Über-

lebensraten von bis zu 60 % nach einjähriger Lagerung bei Umgebungstemperatur und Umgebungsluft aufweisen.

Aufgrund der überraschend hohen Überlebensrate bei der oben beschriebenen Sprühtrocknung ist der Gehalt an lebensfähigen Mikroorganismen ausgeprägt hoch. Das erhaltene Sprühtrocknungsprodukt wird daher auch als Pulverkonzentrat bezeichnet und kann zur Verringerung der Konzentration lebensfähiger Zellen je nach Anwendungsgebiet weiter verdünnt werden. Das Pulverkonzentrat eignet sich besonders zur Herstellung der oben beschriebenen erfindungsgemäßen verdichteten, partikelförmigen Kulturen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher außerdem ein Verfahren zur Herstellung der oben beschriebenen, verdichteten Mikroorganismenkulturen, wobei man

- i) durch trägergebundene Sprühtrocknung, trägergebundene Gefriertrocknung oder trägergebundene Wirbelschichttrocknung ein Pulverkonzentrat der Mikroorganismenkultur herstellt,
- ii) das Pulverkonzentrat gegebenenfalls mit einem oder mehreren Coformulantien versetzt und
- iii) diese Mischung durch Kompaktieren oder Tablettieren verdichtet.

Vorzugsweise wird die verdichtete Mischung in einem weiteren Verfahrensschritt gebrochen, d.h. zerkleinert, und gegebenenfalls unter Verwendung eines Siebs mit geeigneter Maschenweite zu verdichtetem Granulat der gewünschten Größe klassiert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer trockenen, agglomerierten Mikroorganismenkultur, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man

- i) durch trägergebundene Sprühtrocknung, trägergebundene Gefriertrocknung oder trägergebundene Wirbelschichttrocknung ein Pulverkonzentrat der Mikroorganismenkultur herstellt,
- ii) das Pulverkonzentrat gegebenenfalls mit einem oder mehreren Coformulantien versetzt und
- iii) diese Mischung durch Agglomerieren verdichtet.

Unter "trägergebunden" versteht man dabei die Anwesenheit zumindest eines Matrixmaterials des oben beschriebenen Typs bei der Trocknung.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der oben genannten Kompaktierungs- oder Tablettierungs- bzw. Agglomerierungsverfahren wird Stufe i) insbesondere entsprechend dem oben beschriebenen 5 Sprühtrrocknungsverfahren durchgeführt.

Das durch die oben beschriebenen Verdichtungsverfahren erhaltene Produkt wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch als verdichtetes oder kompaktiertes Trockenkonzentrat bezeichnet (cfu-10 Bereich etwa $1 \cdot 10^{10}$ bis $1 \cdot 10^{11}$) und kann als solches, z.B. als konzentrierte Starterkultur, vertrieben werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen verdichteten, trockenen Mikroorganismenkulturen als Starterkulturen für die Herstellung von Nahrungsmittern, wie z. B. für die Herstellung von Milchprodukten, wie Sauerrahm, Buttermilch, Joghurt, Kefir, Kumis, Quark, für die Herstellung von Sauerteig, Rohwurst, sowie für die Herstellung von Futtermitteln, wie z. B. Silage. Zu diesem Zweck wird die 20 Kultur gegebenenfalls nach Auflösen mit dem Nahrungs- oder Futtermittelsubstrat vermischt. Sollte die Zellzahl in der Starterkultur zu hoch sein, kann eine Verdünnung z.B. durch Vermischen mit einem inerten Feststoff, wie z.B. Kalk, insbesondere Futterkalk, angebracht sein.

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind außerdem Nahrungs- und Futtermittel, welche mit Hilfe der erfindungsgemäßen Starterkulturen hergestellt worden sind.

30 Die vorliegende Erfindung wird in den nun folgenden Abschnitten unter Bezugnahme auf die beiliegende Figur genauer beschrieben.

Figur 1 zeigt schematisch eine mögliche Herstellungweise von erfindungsgemäß kompaktiertem Granulat aus Pulverkonzentrat.

35 **Verwendbare Mikroorganismen**

Die vorliegende Erfindung ist grundsätzlich nicht auf bestimmte 40 Mikroorganismenkulturen beschränkt. Vielmehr erkennt der Fachmann, dass die vorliegende Erfindung auf jegliche Mikroorganismen, insbesondere Bakterien und Hefen, anwendbar ist, welche unter den in vorliegender Beschreibung angegebenen Bedingungen in ein trockenes Mikroorganismenpräparat überführbar sind. Eine geeignete Gruppe von Mikroorganismen, die erfindungsgemäß anwendbar 45 sind, stellt die Gruppe der Milchsäure-produzierenden Bakterien dar. Insbesondere handelt es sich hierbei um Bakterien, welche zur homofermentativen Milchsäuregärung geeignet sind, d. h. Glu-

cose über den Fructosebisphosphat-Weg zu Lactat abbauen. Typische Vertreter dieser Gruppe sind Bakterien der Gattungen *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. sowie *Pediococcus* sp. Als konkrete Beispiele für *Lactobacillen* können genannt werden *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus thermophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* und *Lactobacillus plantarum*. Beispiele für geeignete *Streptokokken* sind *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*; und Beispiele für geeignete *Pediococcen* sind *Pediococcus cerevisiae* und *Pediococcus acidilactici*.

15

Fermentation der Mikroorganismen

Zur Durchführung der vorliegenden Erfindung verwendet man vorzugsweise frisch hergestellte Mikroorganismensuspensionen. Die für den jeweiligen Mikroorganismus optimalen Fermentationsmedien bzw. Fermentationsbedingungen sind entweder aus dem Stand der Technik bekannt oder können von dem mit der Aufzucht von Mikroorganismen betrauten Fachmann im Rahmen weniger Routineuntersuchungen bestimmt werden.

Gewöhnlich wird jedoch die Fermentation so durchgeführt, dass man, ausgehend von einer flüssigen oder halbfesten Vorkultur (Kulturvolumen etwa 10 bis 200 ml), frisch hergestelltes, steriles Fermentationsmedium unter sterilen Bedingungen animpft, wobei das Volumenverhältnis von Vorkultur zu Kulturmedium etwa 1:50 bis 1:200 betragen kann. Vorzugsweise verwendet man frisch gezüchtete Vorkulturen, welche sich in einer späten Phase des logarithmischen Wachstums befinden. Die Aufzucht erfolgt je nach zu züchtendem Mikroorganismus unter speziellen, optimierten Wachstumsbedingungen (wie Temperatur und pH). Gewöhnlich liegt die Aufzuchstemperatur im Bereich von etwa 20 bis 40 °C, wobei jedoch beispielsweise bei Aufzucht thermophiler Bakterien deutlich höhere Temperaturen vorliegen können. Der Fermentationsansatz wird in gleichmäßiger Bewegung gehalten, beispielsweise durch moderates Rühren oder Einleiten von Luft oder Stickstoff, um die Ausbildung von Temperatur- oder Stoffgradienten zu verhindern und um auf diese Weise ein kontinuierliches Wachstum zu gewährleisten. Nach Beendigung der Wachstumsphase (beispielsweise bestimmt über das Erreichen einer bestimmten Zelldichte oder den Verbrauch eines der zugesetzten Nährstoffe), kann die Zellsuspension direkt

zur Herstellung der erfindungsgemäßen Trockenpräparate eingesetzt werden.

5 Es besteht jedoch außerdem die Möglichkeit, die erhaltene ursprüngliche Zellsuspension zur Erhöhung der Zellzahl weiter aufzukonzentrieren. Geeignete Methoden hierfür sind beispielsweise Zentrifugation, Ultrafiltration oder Dünnschichtverdampfung. Üblicherweise verwendet man jedoch zur Aufkonzentrierung der 10 Zellsuspension eines Zentrifugationsschritt, welcher vorzugsweise bei verringriger Temperatur, nämlich im Bereich von etwa 4 bis 10 °C, durchgeführt wird.

15 Anstelle der Aufkonzentrierung oder in Kombination mit dieser besteht außerdem die Möglichkeit, die frisch gezüchtete Zellsuspension einem Waschschnitt zu unterziehen, um die Aktivität möglicherweise negativ beeinflussende Kulturbestandteile, wie z. B. Stoffwechselprodukte, zu entfernen. Dabei geht man üblicherweise 20 so vor, dass man, vorzugsweise bei etwa 4 bis 10 °C, zunächst die ursprüngliche Kulturbrühe zu einer Suspension hoher Zelldichte aufkonzentriert und diese anschließend in einer geeigneten Pufferlösung aufnimmt und auf die gewünschte Zelldichte verdünnt. Erforderlichenfalls kann der Waschschnitt auch mehrmals wiederholt werden. Erfindungsgemäß brauchbare Feststoffgehalte von 25 Mikroorganismenkulturen, welche zur Herstellung der erfindungsgemäßen Trockenpräparate geeignet sind, liegen üblicherweise im Bereich von etwa 5 bis 25 Gew.-%, wie z.B. etwa 10 bis 20 Gew.-%.

30 Die Aufzucht der Mikroorganismen kann durch Batch-Fermentation oder kontinuierlich erfolgen.

Zur weiteren Veranschaulichung der Erfindung wird im folgenden Abschnitt die Aufzucht eines Milchsäure-bildenden Bakteriums, 35 insbesondere *Lactobacillus plantarum*, näher beschrieben. Hierbei handelt es sich um ein insbesondere auf intakten und sich zersetzenden Pflanzen zu findendes Bakterium, welches besonders zur Herstellung von Silage-Futtermitteln geeignet ist.

40 Ein geeignetes Fermentationsmedium enthält pro Liter Medium etwa 40 bis 60 g Glucose, etwa 30 bis 60 g Hefeextrakt sowie einen Cocktail üblicher Spurenelemente, wie z. B. Magnesium, Mangan und gegebenenfalls Eisen. Der pH-Wert des Fermentationsmediums liegt 45 bei etwa 6 bis 7. Die Fermentationstemperatur liegt bei etwa 33 bis 38 °C. Durch Zugabe von steriler Natronlauge kann der pH-Wert des Fermentationsmediums im gewünschten Bereich gehalten werden.

Das Wachstum ist beendet, sobald kein Glucoseverbrauch bzw. keine Milchsäureneubildung mehr zu beobachten ist.

5 Gemäß einer erfindungsgemäß brauchbaren Variante der Lactobacil-
lus-Fermentation wird nach Erreichen von etwa 80%igem oder
90%igem Wachstum die Temperatur des Fermentationsmediums auf etwa
42 bis 46 °C erhöht, bis die zugesetzte Glucose vollständig ver-
braucht ist. Erfindungsgemäß wurde festgestellt, daß sich auf
diese Weise hergestellte Kulturen insbesondere bei der Sprüh-
10 trocknung besonders stabil verhalten, wodurch hohe Überlebensra-
ten erzielbar sind. Vergleichbare Aufzuchtvarianten sind auch bei
anderen erfindungsgemäß brauchbaren Mikroorganismen denkbar.

15 20 Nach beendetem Wachstum wird der Fermentationsansatz auf die ge-
wünschte Zelldichte gebracht. Gewünschtenfalls kann die Zellsus-
pension gewaschen werden, bis sie praktisch lactatfrei ist. Die
Zellzahl einer erfindungsgemäß brauchbaren Mikroorganismensuspen-
sion liegt gewöhnlich im Bereich von etwa 1×10^{10} bis etwa $5 \times$
 10^{12} cfu/g Suspension.

Trägersubstanzen

25 Die erfindungsgemäß hergestellten trockenen Mikroorganismenkultu-
ren enthalten neben gegebenenfalls nicht-flüchtigen Bestandteilen
aus dem jeweiligen Fermentationsansatz, wie z. B. Stoffwechsel-
produkte, wenigstens ein Matrixmaterial und gegebenenfalls wei-
tere stabilisierende Substanzen. Diese Coformulantien sind vor-
zugsweise ausgewählt unter anorganischen Salzen oder Puffern, we-
30 nigstens einer weiteren Verbindung, die ausgewählt ist unter
Mono-, Oligo- und Polysacchariden, Polyolen, Polyethern, Amino-
säuren, Oligo- und Polypeptiden, von Milch abgeleiteten Verbin-
dungen, organischen Carbonsäuren, mineralischen Verbindungen, or-
35 ganischen Trägermaterialien, wie z. B. Weizengrießkleie, Algina-
ten, DMSO, PVP (Polyvinylpyrrolidon), CMC (Carboxymethylcellu-
lose), α -Tocopherol, β -Carotin und Gemischen davon.

40 Als Beispiele für geeignete Saccharid-Trägerkomponenten sind zu
nennen Saccharose, Fructose, Maltose, Dextrose, Lactose und Mal-
todextrin. Als Beispiel für ein geeignetes Polyol ist Glycerin zu
nennen. Beispiele für geeignete Aminosäuren sind Glutaminsäure,
Asparaginsäure und die Salze davon. Als Beispiel für einen geeig-
neten peptidischen Träger ist zu nennen Pepton. Als Beispiele für
45 von Milch abgeleiteten Verbindungen ist neben oben genanntem Mal-
todextrin auch Süßmolkepulver zu nennen. Geeignete organische
Carbonsäuren sind beispielsweise Zitronensäure, Äpfelsäure und l-

Ascorbinsäure. Beispiele für geeignete mineralische Träger sind Montmorillonit sowie Palygorskit.

5 Vorzugsweise verwendet man jedoch als Träger für die erfindungsgemäßen trockenen Mikroorganismenpräparate Gemische oben genannter Stoffklassen. Derartige Gemische umfassen vorzugsweise als Hauptkomponente ein Matrixmaterial, wie z. B. eine der oben genannten Saccharidkomponenten oder beispielsweise Süßmolkepulver, und gegebenenfalls einen Nebenanteil wenigstens einer weiteren 10 Komponente, wie z. B. eine Pufferkomponente (beispielsweise Citronensäure) oder ein Antioxidans (beispielsweise L-Ascorbinsäure oder α -Tocopherol). Der Zusatz weiterer stabilisierender Bestandteile, wie z. B. Natriumglutamat und/oder Pepton, hat sich ebenfalls als vorteilhaft erwiesen.

15

Die Matrixkomponente wird in erfindungsgemäß brauchbaren Trägergemischen üblicherweise in etwa 5- bis 30facher Menge der übrigen Trägerbestandteile verwendet. Beispiele für besonders geeignete 20 Trägerkombinationen sind:

- a) Süßmolkepulver/Citronensäure/L-Ascorbinsäure (Gewichtsverhältnis etwa 40:1:1).
- 25 b) Maltodextrin/Lactose/Citronensäure/L-Ascorbinsäure (Gewichtsverhältnis etwa 20:20:1:1), gegebenenfalls ergänzt mit etwa 1,5 Teilen β -Carotin und 0,5 Teilen α -Tocopherol je Teil Citronensäure.
- 30 c) Maltodextrin/Natriumglutamat/L-Ascorbinsäure (Gewichtsverhältnis etwa 10:1,5:1).
- d) Lactose/Glucose/Pepton/Citronensäure (Gewichtsverhältnis etwa 6:6:1,2:1).

35

Die erfindungsgemäßen Trägersubstanzen können der Mikroorganismensuspension entweder als Feststoff oder in gelöster Form zugegeben werden. Vorzugsweise stellt man jedoch eine sterile Lösung des/der Träger her, kühlt diese auf eine Temperatur von 4 bis 10 °C ab und vermischt diese mit der ebenfalls gekühlten Mikroorganismensuspension unter leichtem Rühren. Zur Herstellung einer homogenen Suspension röhrt man das so erhaltene Gemisch unter 45 weiterem Kühlen über einen Zeitraum von etwa 10 Minuten bis 1 Stunde.

Herstellung trockener Mikroorganismenpräparate

Die in oben beschriebener Weise mit dem Träger versetzte Mikroorganismensuspension kann nun in unterschiedlicher Weise getrocknet werden. Als Trocknungsverfahren eignen sich prinzipiell die Gefrierrocknung, die Wirbelschichttrocknung sowie, vorzugsweise die Sprühtrocknung. Unter Sprühtrocknung im Rahmen der vorliegenden Erfindung versteht man auch modifizierte Sprühtrocknungsverfahren, wie z. B. die Sprühagglomeration oder die agglomerierende Sprühtrocknung. Letzteres Verfahren ist auch unter der Bezeichnung FSD (Fluidized Spray Dryer) Verfahren bekannt.

Die Gefrierrocknung zur Herstellung erfindungsgemäßer trockener Mikroorganismenkulturen kann beispielsweise in Anlehnung an die in der EP-A-0 259 739 oder der US-A-3 897 307 beschriebenen Gefrierrocknungsverfahren durchgeführt werden. Auf den Inhalt dieser Druckschriften wird hiermit in vollem Umfang Bezug genommen.

Ein geeignetes Wirbelschicht-Trocknungsverfahren wird beispielsweise beschrieben in der Dissertation von U. Kessler mit dem Thema "Experimentelle Untersuchung und Modellierung der Überlebensrate von Milchsäurebakterien bei der thermischen Trocknung", Technische Universität München, 1993. Auf den Inhalt dieser Druckschrift wird ebenfalls in vollem Umfang Bezug genommen. Zur Durchführung des Wirbelschicht-Trocknungsverfahrens ist es von Vorteil, das zu verwendende Trägermaterial, insbesondere die Matrixkomponente, in einer Wirbelschicht vorzulegen und diese mit der Mikroorganismensuspension in der von U. Kessler beschriebenen Weise zu besprühen.

Das erfindungsgemäß am meisten bevorzugte Trocknungsverfahren ist jedoch die Sprühtrocknung. Erfindungsgemäß brauchbar sind im Wesentlichen alle bisher bekannten Sprühtrocknungstechniken. Das Sprühgut kann beispielsweise im Gleichstrom oder im Gegenstrom getrocknet werden; die Versprühung kann mittels einer Ein- oder Mehrstoffdüse oder mittels eines Zerstäuberrades erfolgen.

Erfindungsgemäß bevorzugt verwendet man Sprühgut mit einem Feststoffgehalt (nach Zugabe des Trägers) von etwa 10 bis 40, wie z. B. etwa 10 bis 25 Gew.-%.

Das erfindungsgemäße Sprühtrocknungsverfahren wird so durchgeführt, dass ein konditioniertes Trockengas mit einer Temperatur im Bereich von mehr als etwa 80 °C in die Trockenvorrichtung eingeleitet wird. Insbesondere sollte die Eintrittstemperatur im Be-

reich von etwa 90 bis 135 °C liegen. Besonders bevorzugt ist eine Trockentemperatur im Bereich von etwa 105 °C. Die Geschwindigkeit des Trocknungsverfahrens ist erfindungsgemäß so ausgelegt, dass die Austrittstemperatur des Trockengutes aus dem Trockner im Bereich von etwa 45 bis 75 °C, insbesondere im Bereich von etwa 50 bis 65 °C, vorzugsweise bei etwa 55 °C liegt.

Von besonderer Bedeutung für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Verwendung von vorkonditionierter, d. h. feuchtigkeitsarmer 10 Trockenluft. Bevorzugt verwendet man Pressluft, deren Taupunkt bei etwa -25 °C liegt.

Das erfindungsgemäße Trocknungsverfahren ist so durchzuführen, 15 dass im Trockengut eine möglichst geringe Restfeuchte vorliegt. Bevorzugt sollte die Wasseraktivität a_w im Trockengut weniger als 0,4 betragen. Zur weiteren Verbesserung der Langzeit-Lagerstabilität werden erfindungsgemäß jedoch Wasseraktivitätswerte von weniger als 0,15, vorzugsweise im Bereich von etwa 0,03 bis 0,1, 20 angestrebt. Der prozentuale Wassergehalt liegt vorzugsweise etwa bei 2 bis 3 Gew.-%. Dies erreicht man am bevorzugtesten dadurch, dass man im Anschluss an den Sprühtrocknungsschritt einen Nachtrocknungsschritt anfügt. Das Trockengut wird hierzu beispielsweise in einem Wirbelbett, vorzugsweise bei einer Temperatur im 25 Bereich von 15 bis 50 °C, über einen Zeitraum von beispielsweise 15 Minuten bis 20 Stunden nachgetrocknet. Als Trockengas dient wiederum vorzugsweise konditionierte Pressluft bzw. konditionierter Stickstoff. Die Nachtrocknung kann aber auch durch Anlegen eines Vakuums von etwa 1 bis 50 Torr über einen Zeitraum von etwa 30 15 Minuten bis 20 Stunden und bei einer Temperatur von etwa 15 bis 50 °C erfolgen. Hierbei ist ein Rühren des Trockengutes beispielsweise mit Hilfe eines Schaufelrührers bevorzugt.

Anstelle der oben beschriebenen physikalischen Nachtrocknungsverfahren ist es außerdem denkbar, dem bei der Sprühtrocknung erhaltenen Trockengut spezielle Trocknungsmittel zuzusetzen. Derartige Trocknungsmittel sollten ihrerseits eine sehr niedrige Wasseraktivität, wie z. B. einen a_w -Wert von 0,01 oder weniger, aufweisen. 35 Als Beispiele für geeignete Trocknungsmittel sind zu nennen anorganische Salze, wie Calciumchlorid und Natriumcarbonat, organische Polymere, wie z. B. das unter der Handelsbezeichnung Kolloidion 90 F erhältliche Produkt, sowie Siliciumdioxid-haltige 40 Trocknungsmittel, wie Kieselgel, Zeolithe, sowie Trocknungsmittel, die unter der Handelsbezeichnung Tixosil 38, Sipernat 22 S oder Aerosil 200 erhältlich sind.

Erfindungsgemäß wurde überraschenderweise festgestellt, dass trotz der relativ hohen Trocknungstemperaturen die Überlebensrate für die erfindungsgemäßen Trockenpräparate ausgezeichnete Werte von nämlich 75 % ± 25 % zeigt.

5

Der Gehalt an lebensfähigen Mikroorganismen liegt im Bereich von etwa 5×10^8 bis 1×10^{12} cfu/g Trockensubstanz. Diese Präparate werden erfindungsgemäß auch als Pulverkonzentrate bezeichnet. Da für einzelne Endanwendungen auch geringere Gehalte an lebensfähigen Mikroorganismen völlig ausreichend sind, können derartige Pulverkonzentrate deshalb gegebenenfalls durch Vermengen mit weiteren inerten Trägermaterial auf die endgültige Zahl lebensfähiger Keime abgemischt werden.

15

Herstellung verdichteter trockener Mikroorganismenkulturen

Die durch oben beschriebene Trocknungsverfahren erhältlichen Pulverkonzentrate besitzen gewöhnlich einen relativ hohen Staubanteil und sind somit für einzelne Anwendungen noch nicht in zufriedenstellender Weise handhabbar. Außerdem erfordern verschiedene Anwendungen eine erhöhte mechanische Stabilität der Trockenkulturen. Es ist deshalb erforderlich, die Eigenschaften der oben beschriebenen Pulverkonzentrate durch einen weiteren Verdichtungsschritt zu verbessern.

Um den Staubanteil der erfindungsgemäßen Pulverkonzentrate zu verringern, besteht die Möglichkeit, diese in herkömmlicher Weise zu einem Granulat zu agglomerieren oder unter Anwendung äußerer Kräfte zu kompaktieren oder zu tablettieren.

Die Agglomeration stellt ein allgemein bekanntes Verfahren dar und wird beispielsweise beschrieben von Schade, A. und Leuenberger, H. in Kontinuierliche Wirbelschicht-Sprühgranulation, Chemie Ingenieur Technik (1992), 64, 1016; Uhlemann, H., Herstellung pharmazeutischer Granulate in einem kombinierten Feuchtgranulations-, und Mehrkammer-Wirbelschichttrocknungsverfahren, Chemie Ingenieur Technik (1990), 62, 822; oder Rosch, M. und Probst R., Granulation in der Wirbelschicht, Verfahrenstechnik (1975), 9, 59.

Erfindungsgemäß brauchbar ist die Agglomeration mit Hilfe eines Mischers. Hierzu füllt man das oben beschriebene Pulverkonzentrat in den Mischer und düst Öl, Wasser oder eine wässrige oder alkoholische Lösung von Zuckern, Polymeren oder anderen Zusatzstoffen

bei, um das Pulverkonzentrat zu agglomerieren.

Außerdem ist erfindungsgemäß brauchbar die Agglomeration in einem Wirbelbett. Hierbei wird Pulverkonzentrat unter Gaszufuhr 5 verwirbelt und mit einer wässrigen oder alkoholischen Lösung von Zuckern, Polymeren oder anderen Zusatzstoffen zum Agglomerataufbau besprüht. Geeignete Verfahren hierzu sind beispielsweise in der WO-A- 88/06181, in der Dissertation von U. Kessler (a.a.O) sowie von K. Fuchs in ZFL (1994) 45, 31 beschrieben. Auf die 10 Offenbarung der obengenannten Druckschriften wird hiermit Bezug genommen.

Durch Agglomeration erhält man granulierte Mikroorganismenkulturen mit einer Korngröße im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 4 mm, 15 insbesondere etwa 0,3 bis 2,5 mm.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist jedoch die Herstellung trockener Mikroorganismenkulturen, welche in Form besonders stark 20 verdichteter Partikel vorliegen. Dies erfolgt erfindungsgemäß entweder durch Tablettierung in üblichen Tablettenpressen oder unter Anwendung üblicher, mit zwei gegenläufigen Walzen ausgerüsteter Kompaktiervorrichtungen.

25 Vor Durchführung der Verdichtung der erfindungsgemäß erhältlichen Pulverkonzentrate werden diesem gewöhnlich ein oder mehrere Co-formulantien oder Zuschlagsstoffe zugesetzt, um die Verarbeitbarkeit zum Endprodukt bzw. die Eigenschaften des Endproduktes zu 30 modifizieren.

Zur Verbesserung der Fließfähigkeit des Pulverkonzentrates setzt man vorzugsweise ein Fließhilfsmittel zu. Als Beispiel für ein geeignetes Fließhilfsmittel sind zu nennen sprühgetrocknete Siliciumdioxidpulver, welche beispielsweise unter der Handelsbezeichnung Sipernat 50 erhältlich sind. Zur Verbesserung der Lagerstabilität der erfindungsgemäßen festen Formulierungen können außerdem übliche Antioxidanzien, wie z. B. L-Ascorbinsäure, zugesetzt werden. Außerdem können zusätzlich Trocknungsmittel des oben bereits 40 beschriebenen Typs eingesetzt werden.

Die Wirkungsweise der erfindungsgemäßen Kulturen wird deutlich verbessert, wenn Vorkehrungen getroffen werden, die, nach Applikation der Kultur, zu einem schnellen Zerfall der Kornstruktur 45 und somit zu einer raschen Freisetzung der Mikroorganismen führen. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, besteht in der Zugabe einer gut wasserlöslichen und damit den Zerfall der Kornstruktur

beschleunigenden Komponente. Als geeignete Verbindungen sind beispielsweise zu nennen Polyethylenglykole, welche z. B. unter der Handelsbezeichnung Pluriol E erhältlich sind.

5 Eine andere, erfindungsgemäß besonders bevorzugte Feststoffformulierung umfasst einen sogenannten Brausezusatz. Hierbei handelt es sich um eine gasfreisetzende Komponente, insbesondere eine CO₂-Quelle, wie z. B. um ein Erdalkalihydrogencarbonat, vorzugsweise Natriumhydrogencarbonat oder um Ammoniumhydrogencarbonat;

10 10 sowie um eine Säurekomponente, vorzugsweise ausgewählt unter Citronensäure, Ascorbinsäure oder Äpfelsäure. Dieser Brausezusatz bewirkt in Gegenwart von Feuchtigkeit eine spontane Gasentwicklung unter Zerfall der Kornstruktur und schneller Freisetzung der Mikroorganismenkeime.

15

Insbesondere für die Herstellung stark verdichteter, kompaktierter oder tablettierter Mikroorganismenkulturen empfiehlt sich die Zugabe von Kompaktierungs- oder Tablettierungshilfsmitteln. Es 20 wurde nämlich erfindungsgemäß überraschenderweise festgestellt, dass durch Zugabe solcher Kompaktierungshilfsmittel die während der Kompaktierung auf die Mikroorganismen einwirkenden Drücke verringert und somit die Überlebensrate der Keime deutlich verbessert wird. Als Beispiele für geeignete Kompaktierungshilfsmittel 25 sind zu nennen mikrokristalline Cellulose, Zucker sowie Mischungen davon. Als konkrete Beispiele für mikrokristalline Cellulose sind Produkte zu nennen, welche unter den Handelsnamen Avicel, Arbocel und Vivapur kommerziell erhältlich sind. Beispiele für geeignete Zucker sind Maltose, Maltodextrin sowie Lactosepräpa- 30 rate, welche unter den Handelsnamen Granulac, Tablettose oder FloLac erhältlich sind. Als Beispiel für ein geeignetes Cellulose/Zuckermischprodukt ist zu nennen das Handelspräparat Cellac-tose. Als weiteres geeignetes Tablettierungshilfsmittel zu nennen ist ein mit PVP granuliertes Lactosepräparat, erhältlich unter dem 35 Handelsnamen Ludipreß.

Weitere geeignete Zusätze sind Polyethylenglykole (Mw 100 bis 10000) welche auf die in der Matrix eingebetteten Zellen eine 40 stabilisierende Wirkung besitzen können.

Beiliegende Figur 1 zeigt ein Fließdiagramm für die erfindungsgemäß Weiterverarbeitung der Pulverkonzentrate zu einem erfindungsgemäßen kompaktierten Produkt. Pulverkonzentrat PK wird im 45 Mischer M1 mit den Coformulantien oder Zuschlagstoffen ZU vermischt, gelangt von dort aus in einen Vorratsbehälter B1, welcher

den Kompaktor A1 speist. Das vom Kompaktor austretende Produktband wird in den Mahlwerken Z1 und Z2 vorzerkleinert bzw. endzerkleinert und im Sieb F1 wird Produkt PR von Staubanteilen mit einer Korngröße von weniger als 0,3 mm abgetrennt. Dieses wird als 5 Rückgut RÜ dem Mischer M1 zugeführt. Das Produkt PR mit einer Korngröße von 0,3 mm oder mehr, wie z. B. 0,3 bis 1,5 mm, gelangt zur Abfüllung oder wird gegebenenfalls einer Weiterbehandlung, wie z. B. einem Coatingprozess, unterzogen.

10

Geeignete Coatingmaterialien, welche vorzugsweise den Zutritt von Feuchtigkeit zum Trockenpräparat zusätzlich erschweren sollen, sind beispielsweise alkoholische Lösungen von PVP, insbesondere eines PVP-Produktes, das unter der Handelsbezeichnung Kollidon 15 VA64 im Handel erhältlich ist. Ein anderes brauchbares Coatingsystem stellt ein Gemisch aus Shellac und Kollidon 25 oder 30 dar, welches mit Titandioxid und Talg supplementiert ist und ebenfalls in alkoholischer Lösung vorliegt.

20 Um die Zellzahl gegebenenfalls weiter zu verringern, kann ein auf diese Weise erhaltenes gecoatetes oder nicht-gecoatetes Produkt beispielsweise mit Kalk oder einem anderen geeigneten mineralischen Zusatz abgemischt werden.

25

Ausführungsbeispiele

In den folgenden Beispielen verwendete Analysenmethoden:

30 a) Bestimmung der Zellzahl:

Zellzahlbestimmungen wurden in der üblichen Art durch serielle Verdünnung mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung und anschließender Plattierung auf MRS-Agar (Difco Laboratories) durchgeführt. Kolo- 35 nienbildende Einheiten ("cfu") wurden nach 48-stündiger Bebrütung bei 37 °C gezählt. Es wurden nur solche Platten berücksichtigt, die mindestens 30 und höchstens 300 Kolonien enthielten. In der Regel wurden drei Platten pro Stufe ausgewertet und der Mittelwert gebildet.

40

Die spezifische Zellzahl einer Probe wurde rechnerisch ermittelt, indem die Zellzahl pro Gramm Probe durch den relativen Anteil des Trockengewichts der Probe geteilt wurde.

45 b) Bestimmung der Überlebensrate bei Trocknung:

Die Überlebensrate bei der Trocknung wurde errechnet aus der spezifischen Zellzahl der Probe vor der Trocknung geteilt durch die spezifische Zellzahl nach der Trocknung. Sie wurde stets in Prozent ausgedrückt.

5

c) Bestimmung der Lagerstabilität:

Um die Lagerstabilität einer getrockneten Probe zu bestimmen, wurde die spezifische Zellzahl der getrockneten Probe unmittelbar 10 nach der Trocknung bestimmt (T_{ago}). Das getrocknete Zellmaterial wurde unter Luft in einem lichtundurchlässigen, dicht verschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) über längere Zeiträume gelagert. In regelmäßigen Abständen wurde die spezifische Zellzahl erneut ermittelt (T_{agN}). Die Lagerstabilität wurde er-15 rechnet aus dem Quotienten der spezifischen Zellzahl T_{agN} /spezifischer Zellzahl T_{ago} .

Lag die spezifische Zellzahl nach der Trocknung z. B. bei $5 \cdot 10^{11}$ cfu/TS und nach 8 Wochen Lagerung bei $4 \cdot 10^{11}$ cfu/g TS, so betrug 20 die Lagerstabilität 80 % des Ausgangswertes.

d) Messung des Feuchtegehaltes:

Elektronisches Feuchtebestimmungsgerät HR 73 der Fa. Mettler 25 Durchführung: ca. 2 g Pulver werden auf dem Messschälchen des Gerätes verteilt. Gemessen wird bei 105°C Trocknungstemperatur bis zur Gewichtskonstanz (Abbruchkriterium: max. 1 mg Gewichtsverlust in 50 sec.).

30 e) Messung der Wasseraktivität:

Gerät Hygroskop DT der Fa. Rotronic AG, Zürich, Schweiz
Das Produkt wird in die Messaufnahmeschale gegeben und diese in die auf 25°C thermostatisierte Messkammer gestellt. Nach dem 35 Schließen der Messkammer und einer Äquilibrierungszeit von 20 Minuten wird der Gerätemesswert abgelesen.

f) DSC-Messung zur Bestimmung der Glasübergangstemperatur T_g :

40 Gerät TA4000 der Fa. Mettler

Einwaage ca. 15 mg, Heizrate $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, Proben wurden während der Messung mit einem Stickstoffstrom umspült.

DSC = Differential Scanning Calorimetry

45 Beispiele zur Kultivierung von Mikroorganismen

Beispiel K1: Batch Fermentation 10 Liter Maßstab

10 l eines Fermentationsmediums, welches folgende Bestandteile enthielt, wurden in einen 14 l-Fermenter gegeben und bei 121 °C für 30 Minuten sterilisiert:

Glucosemonohydrat	550,0 g
50 % Hefeextraktsuspension (pH 4,5 mit Phosphorsäure)	750,0 g
10 Tween 80®	10,0 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	5,0 g
MnSO ₄ * 1 H ₂ O	0,5 g

Nach der Sterilisation wurde das Medium mit steriler 25%iger Na-
15 tronlauge auf pH 5,8 bei 37 °C eingestellt und das Medium mit ei-
nem sanften Strom sterilen Stickstoffs überlagert. Der Fermenter
wurde mit 150 UpM gerührt.

Der Fermenter wurde dann mit 100 ml einer Lactobacillus plantarum
20 Vorkultur (BASF Stamm LU 3244) beimpft, welche zuvor 16 h bei
37 °C in MRS-Nährmedium (Difco Laboratories) gewachsen war. Der
pH-Wert der Kultur wurde kontinuierlich mit 25%iger Natronlauge
auf 6,2 geregelt.

25 Der Verlauf der Fermentation wurde anhand des Natronlaugever-
brauchs verfolgt. Sobald keine Natronlauge mehr verbraucht wurde
(Gesamtverbrauch 890 g), wurde die gesamte Fermentationsbrühe ab-
gelassen und bei 8 °C zentrifugiert. Die Biomasse wurde in etwa
600 g Überstand resuspendiert und auf genau 1000 g mit Überstand
30 aufgefüllt. Der Trockengewichtsanteil wurde mit Hilfe einer In-
frarot-Trockenwaage bestimmt (105 °C bis Gewichtskonstanz). Der
Feststoffgehalt dieser Suspension betrug 15 %.

Beispiel K2: Batch Fermentation 200 Liter Maßstab

35 180 l eines Fermentationsmediums, welches folgende Bestandteile enthielt, wurden in einen 200 l-Fermenter gegeben und bei 121 °C für 30 Minuten sterilisiert:

40 Glucosemonohydrat	11 kg
50 % Hefeextraktsuspension	15 kg
Tween 80®	200 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	200 g
MnSO ₄ * 1 H ₂ O	10 g

Nach der Sterilisation wurde das Medium mit steriler 25%iger Natronlauge auf pH 5,8 bei 37 °C eingestellt und das Medium mit einem sanften Strom sterilen Stickstoffs überlagert.

5 Der Fermenter wurde dann mit 2000 ml einer *Lactobacillus plantarum* Vorkultur (3244) beimpft, welche zuvor 24 h bei 30 °C in MRS-Nährmedium gewachsen war. Der pH-Wert der Kultur wurde kontinuierlich mit 25%iger Natronlauge geregelt.

10 Der Verlauf der Fermentation wurde anhand des Natronlaugeverbrauchs verfolgt. Insgesamt wurde 16,43 kg 25%iger NaOH verbraucht. Sobald keine Natronlauge mehr verbraucht wurde, wurde die gesamte Fermentationsbrühe abgelassen und bei 8 °C mit Hilfe eines kontinuierlichen Separators geerntet. Das Gewicht der 15 ernteten Biomasse betrug nach der Zentrifugation 20 kg. Der Feststoffgehalt dieser Suspension betrug 12,3 %. Die Zellzahl der Suspension betrug $1,04 \cdot 10^{11}$ cfu/g Suspension. Die spezifische Zellzahl betrug $8,45 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (TS).

20 Beispiel K3: Batch Fermentation mit Temperaturschock

Es wurde eine Fermentation analog Beispiel 2 durchgeführt. Bei einem Natronlaugeverbrauch entsprechend 90 % des zu erwartenden Wertes wurde die Fermentertemperatur auf 44 °C erhöht und gehalten, bis der gesamte vorgelegte Zucker verbraucht war. Anschließend wurden die Zellen, wie in Beispiel K2 beschrieben, geerntet. Die Zellzahl der Fermentationsbrühe betrug $1,8 \cdot 10^{11}$ cfu/g bei einem Feststoffgehalt von 21,17 %. Dies entspricht einer spezifischen Zellzahl von $8,5 \cdot 10^{11}$ cfu/g TS.

30

Beispiel K4: Kontinuierliche Fermentation

10 l eines Fermentationsmediums mit folgender Zusammensetzung wurden in einen 14 l-Fermenter eingefüllt und 30 Minuten bei 35 121 °C sterilisiert (Produktionsfermenter):

Glucosemonohydrat	400,0 g
50 % Hefeextraktsuspension (pH 4,5 mit Phosphorsäure)	500,0 g
40 KH_2PO_4	30,0 g
Zitronensäuremonohydrat	21,0 g
Tween 80®	10,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	5,0 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$	1,7 g
45 $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,4 g

In einem zweiten Fermenter mit einem Gesamtvolumen von 3 000 l wurden 2 000 l des gleichen Mediums eingefüllt und sterilisiert (Vorratsfermenter). Beide Fermenter wurden mit einer sterilisierbaren Leitung verbunden. Über ein Zwischengefäß, welches auf einer Waage stand, wurden dann mittels einer automatischen Steuerung jeweils 3 l frischen Mediums pro Stunde in den Produktionsfermenter gepumpt. Die Temperatur des Produktionsfermenters wurde auf 37 °C geregelt. Der pH-Wert wurde mit 25%iger NaOH auf 5,8 geregelt. Der Fermenter wurde mit 150 UpM gerührt und mit 0,1 VVM 10 Stickstoff überlagert.

Über eine zweite Pumpe wurden jeweils 3 l Medium pro Stunde kontinuierlich abgezogen und in einem auf 0 bis 4 °C vorgekühlten Sammelbehälter aus Edelstahl gesammelt. Die Konzentration an Biomasse wurde turbidometrisch bestimmt und betrug 3,5 g/l. Die Glukosekonzentration im Auslauf des Produktionsfermenters betrug nach der anfänglichen Anwachphase zu allen Zeiten 0 g/l. Die Zellzahl der Fermentationsbrühe betrug $1,48 \cdot 10^{10}$ cfu/g Brühe. Der Trockengewichtsanteil der Fermentationsbrühe betrug 6,89 %, entsprechend 217 g TS. Die spezifische Zellzahl betrug $2,15 \cdot 10^{11}$ cfu/g TS.

Beispiel K5: Ernte der Zellen mit Waschschrift zur Entfernung von Natriumlactat

25 72 l Fermenteraustrag aus Beispiel K4 wurden kontinuierlich mit Hilfe eines handelsüblichen Separators bei 8 °C geerntet. Es wurden etwa 7 kg Zellsuspension gewonnen. Zu diesen wurde eine Waschlösung hinzugegeben, welche auf 40 l VE-Wasser, 450 g NaCl 30 und 136 g KH₂PO₄ enthielt. Der pH-Wert der Waschlösung war zuvor mit 25%iger Natronlauge auf 7,0 eingestellt worden. Die etwa 50 l resuspendierter Zellen wurden erneut separiert. Es wurden 3 160 g konzentrierter, gewaschener Zellsuspension gewonnen. Der Feststoffgehalt der Suspension betrug 9,97 %. Die Zellzahl betrug 35 $2,49 \cdot 10^{11}$ cfu/g Suspension. Die spezifische Zellzahl betrug $2,5 \cdot 10^{12}$ cfu/g TS.

Diese gewaschene Zellsuspension war praktisch frei von Natriumlactat. Die Biomassekonzentration wurde turbidometrisch bestimmt. 40 Sie betrug 80 g/l.

Beispiele für Herstellung erfindungsgemäßer Pulverkonzentrate durch Sprühtröcknung

45 Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Sprühtröcknungsversuche zur Herstellung erfindungsgemäßer Pulverkonzentrate werden in einen Labor-Sprühtröckner Typ Niro Minor der Fa. Niro, Kopenhagen,

Dänemark, durchgeführt. Die sprühfertige Bakteriensuspension wird über eine Zweistoffdüse zusammen mit vorkonditionierter, erhitzter Pressluft im Gleichstrom in den Trockenturm der Anlage eingesprüht, das getrocknete Produkt wird mit Hilfe eines Zyklons 5 von der Luft abgetrennt und gesammelt.

Beispiel S1

Zur Herstellung einer Coformulantien-Lösung werden 200 ml VE-Wasser (vollentsalztes Wasser) auf 60 °C erwärmt. Darin werden 150 g Süßmolkepulver, 7,5 g NaCl, 3,8 g KH₂PO₄, 3,8 g Zitronensäure und 3,8 g l-Ascorbinsäure gelöst, mit 40 %igem wässrigem NaOH auf pH 7 eingestellt und mit VE-Wasser auf 400 g Gesamtmasse aufgefüllt. Diese Lösung wird auf 5 °C abgekühlt.

15 200 ml gewaschenes, d. h. im Wesentlichen natriumlactatfreies Ferment-Zentrifugat (hergestellt analog Beispiel K5) (12,7 % Feststoffgehalt (F.G.)) werden im Eisbad bei einer Temperatur von 5 °C vorgelegt und unter Rühren mit 400 g Coformulantien-Lösung, abge-20 kühlt auf 5 °C, versetzt. Die Mischung aus Ferment-Zentrifugat und Coformulantien wird 30 Minuten bei 500 U/min mittels Magnetrührer unter Eisbadkühlung nachgerührt. Anschließend wird die Mischung mittels Sprühtröcknung (Gerät Niro Minor) in ein Pulverkonzentrat A überführt, das am Zyklon abgeschieden wird. Dabei wird die Vor-25 lage, aus der die Mischung zudosiert wird, auf 4 °C gekühlt, die Eintrittstemperatur beträgt 105 bis 110 °C, die Austrittstemperatur beträgt 53,5 bis 55,5 °C. Verwendet wird eine Zweistoffdüse, wobei konditionierte Luft (Taupunkt -25 °C) bei 4 bar zum Versprühen der Mischung aus Ferment-Zentrifugat und Coformulantien ver-30 wendet wird.

Das Pulverkonzentrat A wird in einem mit Stickstoff (Taupunkt = -40 °C) betriebenen Wirbelbett 2 Stunden bei Raumtemperatur nachgetrocknet, wobei man Pulverkonzentrat B erhält.

35 Charakterisierungen:
Sprühfertige Mischung: 35 % F.G., $2,84 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz
Pulverkonzentrat A: Wasseraktivität $a_w = 0,135$
Pulverkonzentrat B: Wasseraktivität $a_w = 0,076$,
40 Feuchtegehalt 3,4 %,
T_g aus DSC-Messung: 54 °C,
 $1,98 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (entspricht 70 % Überlebensrate in der Trocknung)

Lagerstudie Pulver-
45 konzentrat B: cfu-Zahlen bei Raumtemperaturlagerung in unter Raumluft verschlossenen Gefäßen:
 $2,0 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (100 %)

nach 30 Tagen

Beispiel S2

5 Zur Herstellung einer Coformulantien-Lösung werden 200 ml VE-Wasser auf 70 °C erwärmt. Darin werden 75 g Maltodextrin (Glucidex IT6, Fa. Roquette), 75 g Lactose, 7,5 g NaCl, 3,8 g KH₂PO₄, 3,8 g Zitronensäure und 3,8 g l-Ascorbinsäure gelöst, mit 40 %igem wässrigem NaOH auf pH 7 eingestellt und mit VE-Wasser auf 400 g 10 Gesamtmasse aufgefüllt. Diese Lösung wird auf 5 °C abgekühlt.

200 ml gewaschenes, d. h. im Wesentlichen natriumlactatfreies Ferment-Zentrifugat (16,5 % F.G.; hergestellt analog Beispiel K5) bei 5 °C unter Rühren in 400 g Coformulantien-Lösung, abgekühlt 15 auf 5 °C, eingemischt. Die Mischung wird 30 Minuten bei 250 U/min mittels Magnetrührer unter Eisbadkühlung gerührt. Danach werden 101 ml eines nach EP-A-0 479 066 (BASF) hergestellten Solubilisates aus 25 % Tween 80, 5 % β-Carotin und 2 % α-Tocopherol zugegeben und unter Eisbadkühlung 10 Minuten nachgerührt. Anschließend 20 wird diese Mischung mittels Sprühtrocknung, wie in Beispiel S1 beschrieben, in ein Pulverkonzentrat A überführt (Eintrittstemperatur 105 °C, Austrittstemperatur 54 bis 55 °C). Das Pulverkonzentrat A wird nicht nachgetrocknet.

25 Charakterisierungen:

Sprühfertige Mischung: 29 % F.G., $3,84 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz
Pulverkonzentrat A: Wasseraktivität $a_w = 0,065$,

Feuchtegehalt 2,8 %,

T_g aus DSC-Messung: 61 °C,

30 2,22 $\cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (entspricht 58 % Überlebensrate in der Trocknung)

Lagerstudie Pulverkonzentrat A: cfu-Zahlen bei Raumtemperatlagerung in unter Raumluft verschlossenen Gefäßen:

35 1,9 $\cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (86 %) nach 30 Tagen

40

Beispiel S3

400 ml ungewaschenes, d. h. natriumlactathaltiges Ferment-Zentrifugat (hergestellt analog Beispiel K4) (14,3 % F.G.) werden im 45 Eisbad bei einer Temperatur von 5 °C vorgelegt. Unter Rühren bei 700 U/min mittels Magnetrührer gerührt werden nun 57,2 g Glucidex IT6, 8,6 g l-Ascorbinsäure und 5,7 % Natriumglutamat als Fest-

stoffe in das gekühlte Ferment-Zentrifugat eingerührt. Der pH wird mit 40 %igem wässrigem NaOH auf pH 7 eingestellt. Die Mischung aus Ferment-Zentrifugat und Coformulantien wird 30 Minuten bei 500 U/min mittels Magnetrührer bei ca. 3 °C unter Eisbadkühlung nachgerührt. Anschließend wird die Mischung mittels Sprühtrocknung, wie in Beispiel S1 beschrieben, in ein Pulverkonzentrat A überführt (Eintrittstemperatur 105 °C; Austrittstemperatur 54,5 bis 55,5 °C).

10 Das Pulverkonzentrat A wird in einem mit Stickstoff betriebenen Wirbelbett 2 Stunden bei Raumtemperatur nachgetrocknet, wobei man ein Pulverkonzentrat B erhält.

Charakterisierungen:

15 Sprühfertige Mischung: 27 % F.G., $4,65 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz
Pulverkonzentrat A: Wasseraktivität $a_w = 0,197$

Pulverkonzentrat B: Wasseraktivität $a_w = 0,072$,
Feuchtegehalt 3,8 %,

20 T_g aus DSC-Messung: 52 °C,
 $4,64 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (entspricht
100 % Überlebensrate in der Trocknung)

Lagerstudie Pulver-
konzentrat B: cfu-Zahlen bei Raumtemperaturlagerung in
unter Raumluft verschlossenen Gefäßen:

25 $4,1 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (88 %)
nach 28 Tagen

Beispiel S4

30 215 ml gewaschenes, d. h. im Wesentlichen natriumlactatfreies Ferment-Zentrifugat (hergestellt analog Beispiel K5) (14,5 % F.G.) werden im Eisbad bei einer Temperatur von 5 °C vorgelegt. Unter Rühren bei 700 U/min mittels Magnetrührer werden nun 31,2 g

Glucidex IT6, 4,7 g Ascorbinsäure und 3,1 % Natriumglutamat als

35 Feststoffe in das gekühlte Ferment-Zentrifugat eingerührt. Der pH wird mit 40 %igem wässrigem NaOH auf pH 7 eingestellt. Die Mischung aus Ferment-Zentrifugat und Coformulantien wird 30 Minuten bei 500 U/min mittels Magnetrührer unter Eisbadkühlung nachge- rührt. Anschließend wird die Mischung mittels Sprühtrocknung, wie

40 in Beispiel S1 beschrieben, in ein Pulverkonzentrat A überführt (Eintrittstemperatur 105 °C; Austrittstemperatur 54,5 bis 55,5 °C).

Das Pulverkonzentrat A wird in einem mit Stickstoff betriebenen

45 Wirbelbett 2 Stunden bei Raumtemperatur nachgetrocknet, wobei man Pulverkonzentrat B erhält.

Charakterisierungen:

Sprühfertige Mischung: 28 % F.G., $8,76 \cdot 10^{11}$ cfu/g TrockensubstanzPulverkonzentrat B: Wasseraktivität $a_w = 0,044$,

Feuchtegehalt 3,8 %,

5

 T_g aus DSC-Messung: 48 °C, $7,17 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (entspricht 82 % Überlebensrate in der Trocknung)

Lagerstudie Pulverkonzentrat B:

cfu-Zahlen bei Raumtemperaturlagerung in

10

unter Raumluft verschlossenen Gefäßen:

 $3,7 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (52 %)

nach 27 Tagen

Beispiel S5

15

Zur Herstellung einer Coformulantien-Lösung 1 werden 40 ml VE-Wasser vorgelegt und darin 33,3 g Lactose und 6,3 g Pepton gelöst, mit VE-Wasser auf 83 g Gesamtmasse aufgefüllt und mit 40 %igem wässrigem NaOH auf pH 7 eingestellt. Zur Herstellung ei-

20 einer Coformulantien-Lösung 2 werden 40 ml VE-Wasser vorgelegt und darin 33,3 g Glucose-1-hydrat und 5,4 g Zitronensäure gelöst, mit VE-Wasser auf 83 g Gesamtmasse aufgefüllt und mit 40 %igem wässrigem NaOH auf pH 7 eingestellt. Diese Lösungen 1 und 2 werden auf 5 °C abgekühlt.

25

200 ml gewaschenes, d. h. im Wesentlichen natriumlactatfreies Ferment-Zentrifugat (hergestellt analog Beispiel K5) (12,7 % F.G.) werden im Eisbad bei ca. 4 °C unter Rühren mit 83 g der abgekühlten Coformulantien-Lösung 1 vermischt. Die Mischung wird 30 Minuten unter Eisbadkühlung gerührt. Danach werden unter Rühren 83 g der abgekühlten Coformulantien-Lösung 2 zugegeben und unter Eisbadkühlung 30 Minuten nachgerührt. Anschließend wird diese Mischung mittels Sprühtrocknung, wie in Beispiel S1 beschrieben, in ein Pulverkonzentrat A überführt (Eintrittstemperatur 105 °C; Aus-35 trittstemperatur 55 °C).

Das Pulverkonzentrat A wird in einem mit Stickstoff betriebenen Wirbelbett 2 Stunden bei Raumtemperatur nachgetrocknet, wobei man Pulverkonzentrat B erhält.

40

Charakterisierungen:

Sprühfertige Mischung: 29 % F.G., $7,30 \cdot 10^{11}$ cfu/g TrockensubstanzPulverkonzentrat B: Wasseraktivität $a_w = 0,139$,

Feuchtegehalt 3,7 %,

45

 T_g aus DSC-Messung: 45 °C, $5,06 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (entspricht 69 % Überlebensrate in der Trocknung)

Lagerstudie Pulverkonzentrat B:

cfu-Zahlen bei Raumtemperaturlagerung in
unter Raumluft verschlossenen Gefäßen:
 $4,8 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (95 %)
nach 21 Tagen

5

Beispiel S6

Die Herstellung der sprühfertigen Mischungen erfolgte analog zu
10 Beispiel S3. Verwendet wurden hier aber zwei unterschiedliche
Ferment-Zentrifugate:

Beispiel S6a: Batch-Fermentation, wobei das Ferment gegen Ende der Fermentation für 40 Minuten auf 4 °C gekühlt wurde.

15

Das in der Sprühtrocknung gemäß Beispiel S1 (Eintrittstemperatur 107 bis 111 °C; Austrittstemperatur 58 bis 61 °C) erhaltene Pulverkonzentrat A wurde nicht nachgetrocknet.

20 Charakterisierungen:

Sprühfertige Mischung: $3,68 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz

Pulverkonzentrat A: 0,76 · 10¹¹ cfu/g Trockensubstanz (entspricht 21 % Überlebensrate in der Trocknung)

25 Beispiel S6b: Batch-Fermentation, wobei das Ferment gegen Ende der Fermentation auf 44 °C erhitzt wurde. In diesem Beispiel wurde die sprühfertige Mischung geteilt. In einem ersten Versuch wurde das Vorlagegefäß wie in den Beispielen S1 bis S5 und S6a auf 4 °C thermostatisiert. In einem zweiten Versuch wurde das Vorlagegefäß 30 auf 20 °C thermostatisiert.

Die in der Sprühtrocknungen gemäß Beispiel S1 (Eintrittstemperatur 103 bis 110 °C; Austrittstemperatur 59 bis 61 °C) erhaltenen Pulverkonzentrate A wurde nicht nachgetrocknet.

35

Charakterisierungen für Vorlage bei 4 °C:

Sprühfertige Mischung: $3,53 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz

Pulverkonzentrat A: $2,36 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (entspricht 67 % Überlebensrate in der Trocknung)

40

Charakterisierungen für Vorlage bei 20 °C:

Sprühfertige Mischung: $3.53 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz

Pulverkonzentrat A: $1,48 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (entspricht 42 % Überlebensrate in der Trocknung)

46

Formulierungsbeispiele

Entsprechend den im Folgenden angegebenen Rezepturen wurden Trockenmischungen von erfundungsgemäßen Pulverkonzentraten hergestellt und zu kompaktierten Starterkulturpräparaten verarbeitet:

Wenn keine anderen Angaben gemacht wurden, wurde als Trennmittel Leucin und als Fließhilfsmittel Sipernat 50S (sprühgetrocknetes Siliziumdioxid) verwendet.

10

Die Einzelkomponenten der Präparate werden zunächst miteinander vermischt. Hierzu verwendet man beispielsweise einen Pflugscharmischer (Typ Lö 20 der Fa. Lödige). Die auf diese Weise erhaltene Trockenmischung wird in einem Kompaktor kompaktiert. Beispielsweise kann man hierzu einen Laborkompaktor verwenden, der eine Presskraft von 14 kN/cm² aufbringt (z. B. Laborkompaktor L 200 der Fa. Bepex). Das aus dem Kompaktor austretende Produktband wird anschließend auf eine Teilchengröße von ≤ 1,25 mm zerkleinert. Das Rohgranulat wird zur Abtrennung von Feingut einer Teilchengröße von ≤ 0,3 mm gesiebt. Die Nutzgutausbeute beträgt etwa 50 bis 60 % des eingesetzten Materials.

Beispiel F1: Herstellung eines Brausekompakts zur Verwendung als Starterkultur für Silage

25

Präparat A:

Pulverkonzentrat (gemäß Beispiel S2)	200,0 g
Zitronensäure, wasserfrei	95,0 g
NaHCO ₃	95,0 g
PEG (M _w < 400)	8,0 g
Fließhilfsmittel	2,0 g

Präparat B:

Pulverkonzentrat (gemäß Beispiel S2)	100,0 g
Ascorbinsäure, Pulver	47,5 g
NaHCO ₃	47,5 g
PEG (M _w < 400)	4,0 g
Fließhilfsmittel	1,0 g

40 **Präparat C:**

Pulverkonzentrat (gemäß Beispiel S2)	100,0 g
Äpfelsäure	47,5 g
NaHCO ₃	47,5 g
PEG (M _w < 400)	4,0 g
Fließhilfsmittel	1,0 g

Präparat D:

30

Pulverkonzentrat (gemäß Beispiel S2)	100,0 g
Zeolith A (Wessalith P)	20,0 g
Ascorbinsäure, Pulver	37,0 g
NaHCO ₃	36,8 g
5 Trennmittel	3,0 g
Fließhilfsmittel	3,0 g

Beispiel F2: Herstellung eines schnelllöslichen Kompaktats ohne Brausezusatz

10

Pulverkonzentrat (gemäß Beispiel S2)	100,0 g
wasserlös. Tensid (Pluriol EL 500)	90,0 g
Trennmittel	7,0 g
Fließhilfsmittel	3,0 g

15

Beispiel F3: Herstellung eines Kompaktats

Pulverkonzentrat (gemäß Beispiel S5)	100,0 g
Kompaktierhilfsmittel ¹⁾	90,0 g

20 Trennmittel

Fließhilfsmittel	3,0 g
------------------	-------

¹⁾ ausgewählt unter: Avicel PH 102, Vivapur 105, FlowLac, Maltex 20, Cellactose oder Gemische davon

25 Beispiel F4: Herstellung stabilisierter Kompaktate

Basisrezeptur:

30 Pulverkonzentrat (gemäß Beispiel S5)	100,0 g
Kompaktierhilfsmittel	50,0 g
Stabilisator	vgl. Tabelle I
Trennmittel	7,0 g
Fließhilfsmittel	3,0 g

35

40

45

Tabelle I

5	Stabilisator	Komponente	Menge (g)
	A	Zeolith A	40
	B	PEG 4000	40
10	C	Ascorbinsäure ¹⁾	40
	D	PEG 4000	20
		Ascorbinsäure	20
	E	Zeolith A	20
		Ascorbinsäure	20
15	F	Zeolith A	20
		Ascorbinsäure	3
		PEG 4000	17
	G	Zeolith A	10
		Ascorbinsäure	1,5
		PEG 4000	8,5
20	H	Zeolith A	7
		Ascorbinsäure	1
		PEG 4000	6

1) jeweils 1-Ascorbinsäure

Patentansprüche

1. Trockene Mikroorganismenkultur, enthaltend wenigstens eine
5 Mikroorganismen-Spezies in geträgerter Form, dadurch gekenn-
zeichnet, dass die Kultur in Form von Partikeln vorliegt,
welche
 - 10 a) eine Partikelgröße von wenigstens etwa 0,1 mm aufweisen
und
 - b) verdichtet sind.
- 15 2. Mikroorganismenkultur nach Anspruch 1, dadurch gekennzeich-
net, dass die verdichteten Partikel kompaktiertes Brechgut
mit einem Durchmesser von etwa 0,1 mm bis etwa 2 mm umfassen.
- 20 3. Mikroorganismenkultur nach Anspruch 1, dadurch gekennzeich-
net, dass die verdichteten Partikel Tabletten mit einem
Durchmesser von etwa 2 bis 50 mm und einem Verhältnis von
Durchmesser zu Dicke von etwa 1:0,1 bis etwa 10:1 umfassen.
- 25 4. Mikroorganismenkultur nach einem der vorhergehenden Ansprü-
che, dadurch gekennzeichnet, dass sie als weitere Komponente
einen Brausezusatz umfasst.
- 30 5. Mikroorganismenkultur nach einem der vorhergehenden Ansprü-
che, dadurch gekennzeichnet, dass sie als Träger wenigstens
ein Matrixmaterial zur Einbettung der Mikroorganismenzellen
und gegebenenfalls wenigstens ein weiteres, die Zellen stabi-
lisierendes Additiv umfasst.
- 35 6. Mikroorganismenkultur nach einem der vorhergehenden Ansprü-
che, dadurch gekennzeichnet, dass sie etwa 10^8 bis 10^{12} cfu/g
wenigstens einer Mikroorganismen-Spezies enthält.
- 40 7. Mikroorganismenkultur nach einem der vorhergehenden Ansprü-
che, dadurch gekennzeichnet, dass sie wenigstens eine Milch-
säure produzierende Bakterienspezies enthält.
8. Mikroorganismenkultur nach Anspruch 7, dadurch gekennzeich-
net, dass die Bakterienspezies ausgewählt ist unter Bakterien
der Gattung *Lactobacillus* sp.

9. Verfahren zur Herstellung einer trockenen Mikroorganismenkultur, enthaltend wenigstens eine Mikroorganismen-Spezies in geträgerter Form, dadurch gekennzeichnet, dass man
 - 5 a) in einer wenigstens eine Mikroorganismen-Spezies enthaltende Flüssigkeit wenigstens eine zur Ausbildung eines Trägers geeignete Substanz löst oder suspendiert,
 - 10 b) das so erhaltene Gemisch in einem Sprühtrockner trocknet, wobei man zur Sprühtrocknung ein konditioniertes, getrocknetes und auf eine Temperatur im Bereich von mehr als etwa 80 °C erhitztes Gas verwendet, und
 - 15 c) das Trockengut aus dem Sprühtrockner entfernt, wobei dieses eine Austrittstemperatur von etwa 45 bis 75 °C aufweist.
10. Verfahren Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das in Stufe b) verwendete getrocknete Gas einen Taupunkt von weniger als etwa +5 °C aufweist.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass man in einer weiteren Stufe d) das Trockengut einer Nachtrocknung bei einer Temperatur im Bereich von etwa 15 bis 25 50 °C in einer Gasatmosphäre oder im Vakuum unterzieht und/ oder mit wenigstens einem Trocknungsmittel versetzt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Trockengut ein Pulverkonzentrat mit einem Gehalt an lebensfähigen Mikroorganismen von etwa $5 \cdot 10^8$ bis $1 \cdot 10^{12}$ cfu/g erhält.
13. Verfahren zur Herstellung einer trockenen Mikroorganismenkultur gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man
 - 35 i) durchträgergebundene Sprühtrocknung, trägergebundene Gefriertrocknung oder trägergebundene Wirbelschichttrocknung ein Pulverkonzentrat der Mikroorganismenkultur herstellt,
 - 40 ii) das Pulverkonzentrat gegebenenfalls mit einem oder mehreren Coformulantien versetzt und
 - 45 iii) diese Mischung kompaktiert oder tablettiert.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass man das kompaktierte Pulverkonzentrat aus Stufe iii) bricht und gegebenenfalls klassiert.

5 15. Verfahren zur Herstellung einer trockenen, agglomerierten Mikroorganismenkultur, dadurch gekennzeichnet, dass man

10 i) durch trägergebundene Sprühtrocknung, trägergebundene Gefriertrocknung oder trägergebundene Wirbelschichttrocknung ein Pulverkonzentrat der Mikroorganismenkultur herstellt,

15 ii) das Pulverkonzentrat gegebenenfalls mit einem oder mehreren Coformulantien versetzt und

15 iii) diese Mischung agglomeriert.

16. Verfahren nach Anspruch 13 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Sprühtrocknung wie in einem der Ansprüche 9 bis 12 erfolgt.

20 17. Verwendung einer Mikroorganismenkultur nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder hergestellt nach einem der Ansprüche 9 bis 16, als Starterkultur für Nahrungs- und Futtermittel.

25 18. Nahrungs- und Futtermittel, erhältlich unter Verwendung einer Mikroorganismenkultur nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder hergestellt nach einem der Ansprüche 9 bis 16, als Starter.

30

58/iT

35

40

45

1/1

RÜ

PK

ZU

M 1

B 1

A 1

Z 1

Z 2

F 1

PR

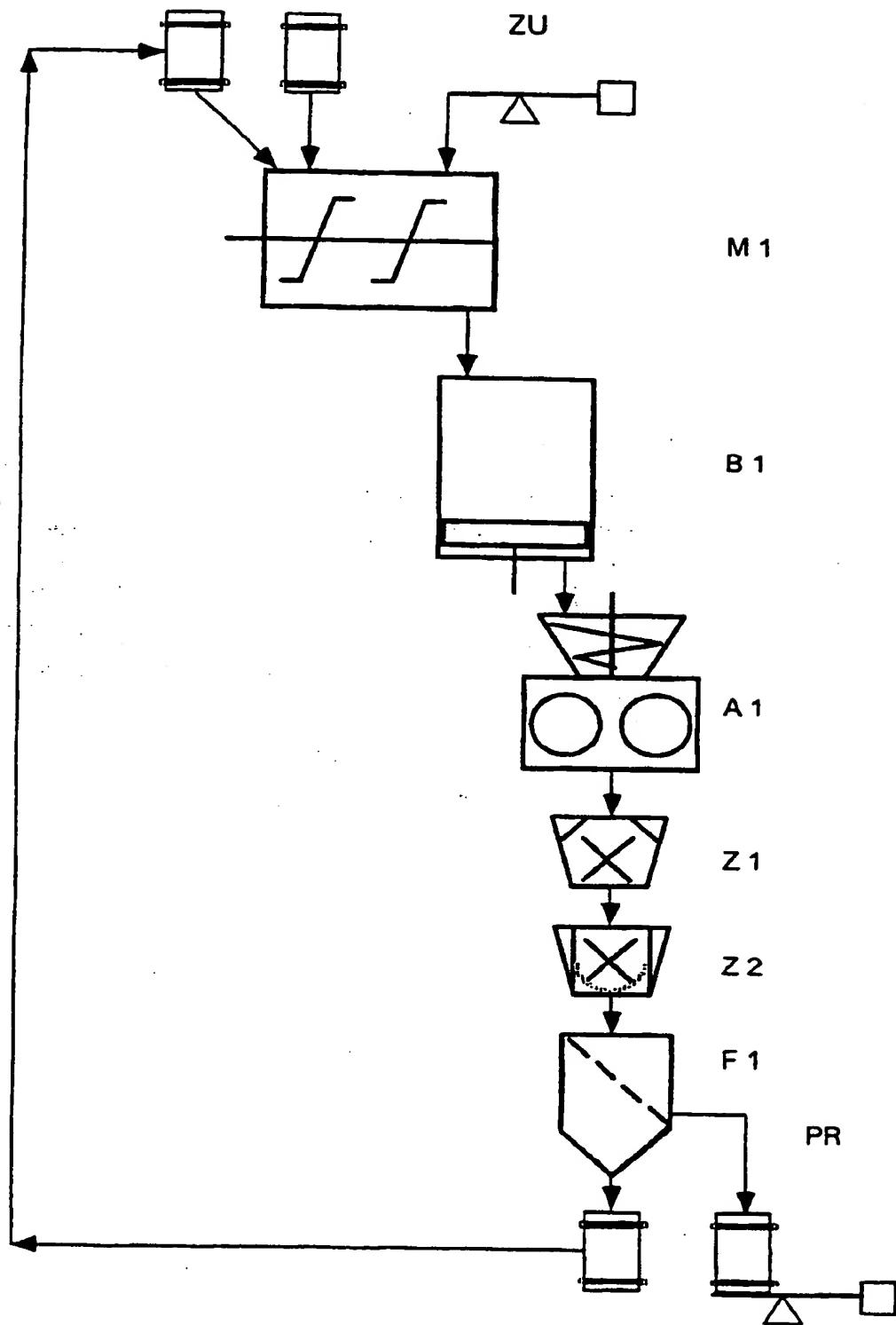


Fig.1

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/EP 99/02925

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N1/04 A23K3/03 A23L1/03 A23K1/00 // (C12N1/04, C12R1:25)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A23K A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 247 253 A (DSO PHARMACHIM) 9 May 1975 (1975-05-09) examples 1-3 claim 3 ---	1-3, 5, 7-9, 13, 15, 16
X	US 3 407 072 A (AIZAWA MINORU ET AL) 22 October 1968 (1968-10-22) abstract; examples 1-7 ---	9
X	US 3 536 498 A (ANO TOSHICHI ET AL) 27 October 1970 (1970-10-27) abstract; examples 1-7, 10-13 ---	9
X	US 3 897 307 A (PORUBCAN RANDOLPH S ET AL) 29 July 1975 (1975-07-29) example 3; table III column 7, line 66 - column 8, line 8 ---	9, 12
A		13 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 August 1999

Date of mailing of the international search report

03/09/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/02925

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 8745 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D13, AN 87-319054 XP002113266 & SU 1 292 706 A (APPL BIOCHEM RES), 28 February 1987 (1987-02-28) abstract ---	9,10
X	EP 0 520 748 A (PAFRA LTD) 30 December 1992 (1992-12-30) abstract; examples 7-10 ---	9,12
X	GB 1 073 030 A (GRIFFON ET AL) 21 June 1967 (1967-06-21) table II ---	1-3,6
X	GB 2 016 043 A (DANOCHEMO AS) 19 September 1979 (1979-09-19) abstract examples 1,3 ---	1,5,7,8, 13,15
A	EP 0 818 529 A (NESTLE SA) 14 January 1998 (1998-01-14) page 2 -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/02925

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
FR 2247253	A 09-05-1975	BG AR AT AT CS DD DE GB JP NL SE US YU	19633 A 201790 A 336782 B 812974 A 191452 B 114222 A 2448648 A 1439738 A 50088209 A 7413373 A 7412625 A 3988440 A 274574 A	10-10-1975 15-04-1975 25-05-1977 15-09-1976 31-07-1979 20-07-1975 24-04-1975 16-06-1976 15-07-1975 15-04-1975 14-04-1975 26-10-1976 30-06-1982
US 3407072	A 22-10-1968	NONE		
US 3536498	A 27-10-1970	BE FR GB NL	702202 A 1535830 A 1146367 A 6710736 A, B	15-01-1968 05-02-1968
US 3897307	A 29-07-1975	AU AU BE CA CH DE DK FR GB IT NL SE SE	473243 B 8014475 A 828181 A 1041929 A 596302 A 2520128 A 199975 A, B, 2299404 A 1469218 A 1049418 B 7505227 A 422079 B 7507580 A	17-06-1976 17-06-1976 18-08-1975 07-11-1978 15-03-1978 29-04-1976 24-04-1976 27-08-1976 06-04-1977 20-01-1981 27-04-1976 15-02-1982 26-04-1976
SU 1292706	A 28-02-1987	NONE		
EP 0520748	A 30-12-1992	AU AU CA EP JP US	659645 B 1848692 A 2072420 A 0906951 A 5293354 A 5928469 A	25-05-1995 07-01-1993 27-12-1992 07-04-1999 09-11-1993 27-07-1999
GB 1073030	A	NONE		
GB 2016043	A 19-09-1979	DE DK FR SE	2908639 A 76779 A 2419031 A 7902104 A	13-09-1979 09-09-1979 05-10-1979 09-09-1979
EP 0818529	A 14-01-1998	AU BR CA CN JP NZ	2851597 A 9703941 A 2208727 A 1173974 A 10057031 A 328264 A	15-01-1998 01-09-1998 09-01-1998 25-02-1998 03-03-1998 29-06-1999

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/02925

A. KLASSEIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N1/04 A23K3/03 A23L1/03 A23K1/00 // (C12N1/04, C12R1:25)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N A23K A23L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FR 2 247 253 A (DSO PHARMACHIM) 9. Mai 1975 (1975-05-09) Beispiele 1-3 Anspruch 3	1-3,5, 7-9,13, 15,16
X	US 3 407 072 A (AIZAWA MINORU ET AL) 22. Oktober 1968 (1968-10-22) Zusammenfassung; Beispiele 1-7	9
X	US 3 536 498 A (ANO TOSHIKI ET AL) 27. Oktober 1970 (1970-10-27) Zusammenfassung; Beispiele 1-7,10-13	9
X	US 3 897 307 A (PORUBCAN RANDOLPH S ET AL) 29. Juli 1975 (1975-07-29) Beispiel 3; Tabelle III	9,12
A	Spalte 7, Zeile 66 - Spalte 8, Zeile 8	13
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

25. August 1999

03/09/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lejeune, R

INTERNATIONALER FORSCHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02925

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ²	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 8745 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D13, AN 87-319054 XP002113266 & SU 1 292 706 A (APPL BIOCHEM RES), 28. Februar 1987 (1987-02-28) Zusammenfassung ----	9,10
X	EP 0 520 748 A (PAFRA LTD) 30. Dezember 1992 (1992-12-30) Zusammenfassung; Beispiele 7-10 ----	9,12
X	GB 1 073 030 A (GRIFFON ET AL) 21. Juni 1967 (1967-06-21) Tabelle II ----	1-3,6
X	GB 2 016 043 A (DANOCHEMO AS) 19. September 1979 (1979-09-19) Zusammenfassung Beispiele 1,3 ----	1,5,7,8, 13,15
A	EP 0 818 529 A (NESTLE SA) 14. Januar 1998 (1998-01-14) Seite 2 ----	1-18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02925

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
FR 2247253	A 09-05-1975	BG AR AT AT CS DD DE GB JP NL SE US YU	19633 A 201790 A 336782 B 812974 A 191452 B 114222 A 2448648 A 1439738 A 50088209 A 7413373 A 7412625 A 3988440 A 274574 A	10-10-1975 15-04-1975 25-05-1977 15-09-1976 31-07-1979 20-07-1975 24-04-1975 16-06-1976 15-07-1975 15-04-1975 14-04-1975 26-10-1976 30-06-1982
US 3407072	A 22-10-1968	KEINE		
US 3536498	A 27-10-1970	BE FR GB NL	702202 A 1535830 A 1146367 A 6710736 A, B	15-01-1968 05-02-1968
US 3897307	A 29-07-1975	AU AU BE CA CH DE DK FR GB IT NL SE SE	473243 B 8014475 A 828181 A 1041929 A 596302 A 2520128 A 199975 A, B, 2299404 A 1469218 A 1049418 B 7505227 A 422079 B 7507580 A	17-06-1976 17-06-1976 18-08-1975 07-11-1978 15-03-1978 29-04-1976 24-04-1976 27-08-1976 06-04-1977 20-01-1981 27-04-1976 15-02-1982 26-04-1976
SU 1292706	A 28-02-1987	KEINE		
EP 0520748	A 30-12-1992	AU AU CA EP JP US	659645 B 1848692 A 2072420 A 0906951 A 5293354 A 5928469 A	25-05-1995 07-01-1993 27-12-1992 07-04-1999 09-11-1993 27-07-1999
GB 1073030	A	KEINE		
GB 2016043	A 19-09-1979	DE DK FR SE	2908639 A 76779 A 2419031 A 7902104 A	13-09-1979 09-09-1979 05-10-1979 09-09-1979
EP 0818529	A 14-01-1998	AU BR CA CN JP NZ	2851597 A 9703941 A 2208727 A 1173974 A 10057031 A 328264 A	15-01-1998 01-09-1998 09-01-1998 25-02-1998 03-03-1998 29-06-1999

This Page Blank (uspto)